



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **04046143 A**(43) Date of publication of application: **17.02.92**

(51) Int. Cl. **C07C229/08**  
**C07C227/26**  
**G01R 33/28**  
**// C07B 59/00**

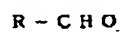
(21) Application number: **02150033**(71) Applicant: **HITACHI LTD**(22) Date of filing: **11.08.90**(72) Inventor: **OKUDE KOJIRO**

(54) **SYNTHESIS OF ISOTOPIC MULTIPLY LABELED  
 AMINO ACID**

COPYRIGHT: (C)1992,JPO&amp;Japio

## (57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the title compound labeled with both  $N^{15}$  and  $C^{13}$  by reaction between an aldehyde and  $N^{15}$ -concentrated ammonium chloride and  $C^{13}$ -concentrated sodium cyanide etc. and by hydrolysis of the resulting aminonitrile.

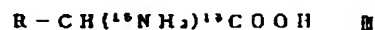


I

CONSTITUTION: An aldehyde of formula I (R is H, alkyl, phenyl, etc.) is reacted with  $N^{15}$ -concentrated ammonium chloride and  $C^{13}$ -concentrated sodium or potassium cyanide into an aminonitrile of formula II, which is then hydrolyzed with hydrochloric or sulfuric acid, thus obtaining the objective compound of formula III. No requirement of the intermediate's purification and isolation will lead to reduced loss of the expensive isotopic concentrated raw materials, thus synthesizing the objective compound easily in one step. Although it is ideal that the ammonium chloride and alkali cyanide as isotopic concentrated raw materials be each  $\approx 99\%$  in concentration rate, this is not a requirement.



II



III

## ⑫ 公開特許公報(A) 平4-46143

⑬ Int. Cl.<sup>8</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成4年(1992)2月17日  
 C 07 C 229/08 6742-4H  
 227/26 6742-4H  
 G 01 R 33/28 8217-4H  
 // C 07 B 59/00 7621-2J G 01 N 24/02 A  
 審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 同位体多重標識アミノ酸の合成法

⑯ 特 願 平2-150033

⑰ 出 願 平2(1990)6月11日

⑱ 発 明 者 奥 出 幸 二 郎 茨城県日立市久慈町4026番地 株式会社日立製作所日立研究所内

⑲ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

⑳ 代 理 人 弁理士 小川 勝男 外2名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

同位体多重標識アミノ酸の合成法

## 2. 特許請求の範囲

1. 化学式  $R-CHO$  ( $R$ はH、 $CH_3$ 又は $C_2H_5$ 、

等のアルキル基、フェニル基、及びアミノ基・  
 水酸基・カボキシル基等の官能基で置換された  
 アルキル基誘導体又はフェニル基誘導体)で置  
 わされる各種アルデヒドに、窒素15を濃縮した  
 塩化アンモニウムと、炭素13を濃縮したシ  
 アン化ナトリウム又はシアン化カリウムを反応  
 させ、生成する各種のアミノニトリル

$R-CH(^{15}NH_2)^{13}CN$  を加水分解すること  
 により、アミノ基を窒素15で、カルボキシル  
 基を炭素13で、同時に標識したアミノ酸

$R-CH(^{15}NH_2)^{13}COOH$  を合成すること  
 を特徴とする同位体多重標識アミノ酸合成法。

## 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は同位体で多重に標識されたアミノ酸の

合成法に関する。

〔従来の技術〕……

タンパク質は多数のアミノ酸が結合した、生体  
 内で重要な機能をもつ巨大分子である。その研究  
 法として、溶液での核磁気共鳴(NMR)スペク  
 トルを測定し、各々のシグナルをタンパク質を構  
 成するアミノ酸と対応づけることにより、構造解  
 析を行なう手法が知られている。NMRスペクト  
 ルは、プロトン、炭素13( $^{13}C$ )、窒素15  
 ( $^{15}N$ )等の原子核を測定対象とする。このうち、  
 プロトンはピークの重なりが大きく、タンパク質  
 等の複雑な分子への適用は困難であることが多い。  
 また $^{13}C$ 、 $^{15}N$ は、同位体の天然依存比が、それ  
 ぞれ約1.1%、約0.4%と小さいため、天然依  
 存比のままでは十分なシグナル強度が得られない  
 ことが多い。このため、人工的に $^{13}C$ 、 $^{15}N$ を濃  
 縮したアミノ酸を合成し、これを標識化合物とし  
 て用いてシグナル強度を大きくする方法が行なわ  
 れている。このような標識化合物の合成法は種々  
 の例が知られているが、例えばジャーナル オブ

バイオロジカル ケミストリー 162巻(1946)年  
第297頁から第307頁(J. Biol. Chem., 162,  
(1946), pp 297-307)には、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$   
で二重標識されたグリシン( $^{15}\text{NH}_2$ ,  $^{13}\text{COOH}$ )  
の合成法が記載されている。これは第2式に示し  
たように、フタルイミド( $^{15}\text{N}$ )をホルムアルデ  
ヒド、塩化チオニル、シアン化ナトリウム( $^{13}\text{C}$ )  
と順に反応させる方法である。

〔発明が解決しようとする課題〕

上記従来技術では、目的の二重標識されたアミ  
ノ酸を得るまでに多段階の反応を必要とし、さら  
に各段階ごとに中間体を精製分離する必要がある。  
このため、反応途中での損失が大きく、目的とす  
るアミノ酸の収率が低下し、高価な同位体濃縮原  
料が有効に使われないという問題があった。

本発明は、 $^{15}\text{N}$ 及び $^{13}\text{C}$ で二重標識したアミノ  
酸を一段階で簡便に合成する方法を提供すること  
を目的とし、これにより、同位体濃縮原料の損失  
を小さくすることを目的とする。

〔課題を解決するための手段〕

$^{13}\text{COOH}$ )を得ることができる。得られたアミ  
ノ酸は種々の既知の方法で精製する。

同位体濃縮原料として、塩化アンモニウム、シ  
アン化アルカリは、それぞれ濃縮率が $^{15}\text{N} \geq 99\%$   
、 $^{13}\text{C} \geq 98\%$ であることが理想的であるが、  
より低い濃縮率の原料でもかまわない。濃縮率  
10%程度でもNMR測定に役立てることは充分  
可能である。

〔作用〕

ここで採用したシュトレッカー合成法はアルデ  
ヒドからアミノ酸を合成する簡便な方法で、中間  
体の精製・分離は必要ではない。従つて操作手順  
は少なくなり、中間段階での試料の損失は少なく  
することができる。アミノ酸の前駆体に用いたアル  
デヒドは比較的安価な原料で入手しやすい。同  
位体の原料である $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ や $\text{Na}^{13}\text{CCN}$ 、  
 $\text{K}^{13}\text{CCN}$ などは、同位体濃縮率の高いものが市販  
されており、安価で入手しやすい。

〔実施例〕

(実施例1)

上記目的を達成するために、以下に記した手段  
を用いた。

全体の合成系路は第1式に示した。これはシュ  
トレッカー合成として知られるアミノ酸合成法を  
応用したものである。アミノ酸の前駆体として、  
ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド及びその他  
の各種アルデヒド $\text{R}-\text{CHO}$ ( $\text{R}$ は $\text{H}$ 、 $\text{CH}_3$ 、  
 $\text{C}_2\text{H}_5$ 等のアルキル基、フェニル基、及びアミノ  
基、カルボキシル基、水酸基等で置換されたアル  
キル基誘導体又はフェニル基誘導体)を用いる。  
 $^{15}\text{N}$ の原料として、 $^{15}\text{N}$ を濃縮した塩化アンモニ  
ウム( $^{15}\text{N}$ )( $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ )を用いる。 $^{13}\text{C}$ の原  
料として $^{13}\text{C}$ を濃縮したシアン化アルカリ( $^{13}\text{C}$ )  
( $\text{M}^{13}\text{CCN}$ 、 $\text{M}$ はカリウム、ナトリウム等のアル  
カリ金属)を用いる。上記のアルデヒド $\text{R}-\text{CHO}$   
と $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ の混合物に $\text{M}^{13}\text{CCN}$ を加えること  
により、各種のアミノニトリル( $^{15}\text{NH}_2$ ,  $^{13}\text{CCN}$ )  
( $\text{R}-\text{CH}({}^{15}\text{NH}_2){}^{13}\text{CCN}$ )が生成する。これを  
塩酸又は硫酸で加水分解することにより、目的と  
する各種の二重標識されたアミノ酸( $^{15}\text{NH}_2$ ,


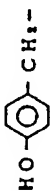
アラニン( $^{15}\text{NH}_2$ ,  $^{13}\text{COOH}$ )塩酸塩の合成  
法を第3図により以下に説明する。

アセトアルデヒド13gをエーテル10ccに加  
えてフラスコ1に入れて氷で冷却する。これに  
 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ( $^{15}\text{N} \geq 99\%$ )18gを水55ccに  
溶かして加える。次に $\text{Na}^{13}\text{CCN}$ ( $^{13}\text{C} \geq 99\%$ )  
15gを水40ccに溶かし、滴下ロート2から徐  
徐に加える。このとき、混合物の温度は10℃以  
下に保つようにする。次に混合物を室温にもどし、  
4時間以上充分かくはんを続ける。次にフラスコ  
1をドラフト内に入れ、シアン化水素の発生に注  
意しながら、濃塩酸60ccを加える。蒸留して固  
型物が残るまで十分に濃縮する。2%の塩酸を含  
むエタノール10.0ccを加えて固型物を溶かす。  
冷却後、エーテル30ccを加え、沈殿する固体を  
濾別する。濾液を蒸留し、減圧下でエタノール、  
エーテルを充分留去させると、目的とするアラニ  
ン( $^{15}\text{NH}_2$ ,  $^{13}\text{COOH}$ )塩酸塩の粗製物を得る。

(実施例2)

実施例1のアセトアルデヒドを他のアルデヒド

に変更することにより、各種のアミノ酸( $^{15}\text{NH}_2$ ,  $^{13}\text{COOH}$ )を合成することができる。例を下表にまとめる。

アミノ酸( $^{15}\text{NH}_2$ , $^{13}\text{COOH}$ )	アルデヒド	R-
グアニン	ホルムアルデヒド	H-
アラニン	アセトアルデヒド	$\text{CH}_3$
バリン	2-ホルミルプロパン	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$
フェニルアラニン	フェニルアセトアルデヒド	
ロイシン	4-ヒドロキシ フェニルアセトアルデヒド	
アスパラギン酸	ホルミル酢酸	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-$
アスパラギン	ホルミルアセトアミド	$\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-$

また、上表に記載されていないアルデヒドについても、同様の方法で対応するアミノ酸( $^{15}\text{NH}_2$ ,  $^{13}\text{COOH}$ )を合成することができる。

#### (実施例3)

NMR測定用試料への応用。

実施例1又は2で合成したアミノ酸( $^{15}\text{NH}_2$ ,  $^{13}\text{COOH}$ )を原料として、タンパク質を合成する。この合成は、通常の化学的方法や生物学的的方法によつて行なうことができる。このとき、通常は一種類のアミノ酸(例えばアラニン)のみを $^{15}\text{NH}_2$ ,  $^{13}\text{COOH}$ で標識したものを使い、他のアミノ酸には通常の未標識のものを用いる。合成したタンパク質を水溶液とし、NMRを測定すると、第4図のように、標識されたアラニンの $^{15}\text{NH}_2$ ,  $^{13}\text{COOH}$ のみが強く観測される。このシグナルの位置、数を解析することにより、試料としたタンパク質中のアラニン残基についての構造情報が得られる。また、標識したアミノ酸を二種類以上(例えばグアニンとアラニン)用いてタンパク質を合成し、同様にNMRを測定するこ

ともできる。この場合は、タンパク質中のグアニン残基、アラニン残基についての構造情報が得られ、更にグアニン残基とアラニン残基の間の相互的位置情報を得ることもできる。例えば第5図のように、細かく分裂した $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ シグナルが得られた時は、標識したアミノ酸どうしが第6図(b)のように隣りあっていることを示す。

また、タンパク質以外でも、アミノ酸を構成要素とする化学物質であるならば、アミノ酸( $^{15}\text{NH}_2$ ,  $^{13}\text{COOH}$ )はNMRの測定の対象として使用することができ、構造解析に役立てることができる。

#### (実施例4)

本発明で合成した標識アミノ酸はNMRに限らず、同位体を利用する他の分析方法の測定対象へ応用することが可能である。

例えば、質量スペクトルに用いて、天然同位体存在比からのズレを測定して分析に用いることができる。

また、 $\text{Na}^{13}\text{CN}$ や $\text{K}^{13}\text{CN}$ のかわりに炭素

14を濃縮した $\text{Na}^{15}\text{CN}$ や $\text{K}^{15}\text{CN}$ を用いて、 $^{15}\text{C}$ の放射能測定による放射分析へ応用することができる。必要に応じて、窒素、炭素を更に短寿命の核種(例えば $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ など)で標識し、放射分析を行なう方法へも応用できる。

#### 〔発明の効果〕

本発明によれば、以上に説明したように、アミノ基を $^{15}\text{N}$ で、カルボキシル基を $^{13}\text{C}$ で同時に標識した各種のアミノ酸を簡単に合成することができる。また、中間での処理が少ないので、高価な同位体濃縮原料の損失を少なくし、目的のアミノ酸( $^{15}\text{NH}_2$ 、 $^{13}\text{COOH}$ )の収率を上げることができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明を説明する反応式第1式を示す図、第2図は従来技術を説明する反応式を示す図、第3図は本発明による合成方法を示す図、第4図は本発明により合成したアミノ酸( $^{15}\text{NH}_2$ 、 $^{13}\text{COOH}$ )をNMR測定に応用したときのスペクトル図、第5図は第4図と同じくNMRスペク

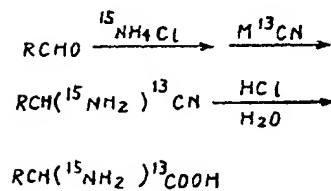
トル図、第6図はタンパク質中のアミノ酸の結合を示す図である。

1…フラスコ、2…滴下ロート、3…温度計、4…氷水浴、5…磁気かくはん子、6…かくはん機、7…標識されたアミノ酸、8…未標識のアミノ酸。

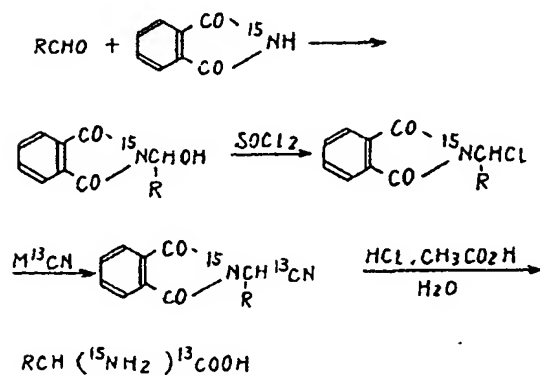
代理人 井理士 小川勝男



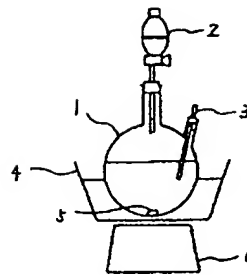
第1図



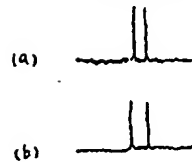
第2図



第3図



第4図



第5図



## 第 6 図

